

ограничивается территорией Урала и Западной Сибири; третья (12 %) характерна для Сахалина и Восточной Сибири (Иркутская область). Использование другого маркера (CR) подтверждает выделение второй группы гаплотипов, в то время как разделить остальные две с его помощью не удастся; данную проблему возможно решить путем привлечения дополнительных маркеров, например, 16S рРНК.

Результаты, полученные по 28S и 12S рРНК, предполагают сравнительно недавнее расселение популяции *I. persulcatus* по ареалу, скорее всего, из одного рефугиума, сформировавшегося во время последнего плейстоценового оледенения. В то же время использование варибельных маркеров позволяет выявить сложную генетическую структуру популяций *Ixodes persulcatus*, сложившуюся после расселения. Дальнейшее изучение популяций данного вида, а также переносимых им патогенов поможет понять процессы, которые привели к наблюдаемому распределению очагов передающихся клещами инфекций.

#### Библиографический список

Casati S. et al. Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) // Infect Genet Evol. 2008. Vol. 8. № 2. P. 152-158.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ У *LUPINUS LUTEUS*

**Н.С. Белозерова, Е.С. Пожидаева, В.В. Кузнецов**

Учреждение Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва E-mail: n\_belozerova@list.ru

Фермент альтернативная оксидаза (АОХ) к настоящему времени обнаружена у всех исследованных видов растений, у многих эукариотических видов водорослей, грибов, а так же в митохондриях некоторых простейших. Она является альтернативной терминальной оксидазой в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий и осуществляет окисление убихинола с восстановлением молекулы кислорода до воды, минуя два из трех пунктов сопряжения на ЭТЦ. У растений фермент представлен несколькими формами, кодируемыми двумя семействами ядерных генов АОХ (АОХ1 и АОХ2), подразделяющихся на подсемейства. Различные формы либо экспрессируются конститутивно, либо регулируются различными факторами (Polidoros et al., 2009).

Несмотря на сохранение своей функции у представителей различных систематических групп фермент сильно различается по нуклеотидной последовательности даже у близкородственных видов. Аминокислотная

последовательность так же весьма различается, однако есть консервативные последовательности.

Для изучения гормональной регуляции экспрессии генов АОХ желательно секвенировать гены этого фермента у растений, на которых показан эффект фитогормонов на уровне дыхания. Такой системой являются изолированные семядоли люпина желтого (*Lupinus luteus* L.) (Белозерова и др., неопубликованные данные). Однако ядерный геном этого вида не секвенирован.

Для обнаружения генов АОХ у люпина мы использовали вырожденные праймеры, подобранные по консервативному участку, идентифицированному при сравнении аминокислотных и нуклеотидных последовательностей арабидопсиса (NM\_113135), табака (S71335), картофеля (AB176953) и сои (X6870). Амплификацию проводили с тотальной ДНК, а также с кДНК люпина. Градиентный ПЦР проводили с понижением температуры отжига праймеров на 2 градуса с 68 °С до 50 °С, и последующим повторением 20 циклов при 50 °С. В результате, при использовании в ПЦР в качестве матрицы тотальной ДНК люпина, был получен фрагмент ДНК ожидаемого размера (около 200 п.н.). Этот фрагмент был элюирован из геля и клонирован в вектор pTZ57R/T. Для амплификации плазмиды использовали клетки *E. coli* штамм JM109. На основе бело-голубой селекции были отобраны колонии, потенциально несущие вставку фрагмента АОХ. Ее наличие было проверено при помощи ПЦР с универсальными праймерами M13. Идентификацию нуклеотидной последовательности данного фрагмента проводили секвенированием. В результате получены две последовательности длиной 177 и 179 п.н. со степенью взаимной гомологии 69 %. Одна из последовательностей гомологична (до 85 % сходства) последовательности гена АОХ1, вторая – последовательности гена АОХ2 (до 80 % сходства). Из чего можно предположить, что у люпина есть по крайней мере два гена АОХ, относящихся к разным семействам. В настоящий момент ведётся работа по идентификации полноразмерной последовательности генов АОХ у люпина с использованием RACE-ПЦР.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 10-04-00665, 09-04-00410, 10-04-00594.

#### Библиографический список

*Polidoros A., Mylona P., Arnholdt-Schmitt B.* Aox gene structure, transcript variation and expression in plant // *Physiologia Plantarum*. 2009. V 137. № 4. pp. 342-353.